

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 10 November 2000 (10.11.00)	
International application No. PCT/JP00/02023	Applicant's or agent's file reference KUV-101PCT
International filing date (day/month/year) 30 March 2000 (30.03.00)	Priority date (day/month/year) 31 March 1999 (31.03.99)
Applicant AMAGAI, Masayuki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 October 2000 (18.10.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election
- ☒
- was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

BEST AVAILABLE COPY

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Diana Nissen Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

BLANK (USPT)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference KUV-101PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/02023	International filing date (day/month/year) 30 March 2000 (30.03.00)	Priority date (day/month/year) 31 March 1999 (31.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01K 67/027		
Applicant KEIO UNIVERSITY		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 October 2000 (18.10.00)	Date of completion of this report 09 May 2001 (09.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPT)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02023

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-20, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 4-6,8,10,11, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 2,3,7,9, filed with the letter of 22 February 2001 (22.02.2001)
- ☒ the drawings:
pages 1-4, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1/2-2/2, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 1
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02023

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	2-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	2-11	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	2-11	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The inventions set forth in Claims 2-11 appear to involve an inventive step with respect to the documents cited in the international search report.

None of the documents cited in the international search report discloses the use of non-human mammals lacking a gene for an autoimmune disease antigen, and persons skilled in the art cannot easily conceive of this matter.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協定条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 A01K 67/027	A1	(11) 国際公開番号 WO00/57695 (43) 国際公開日 2000年10月5日(05.10.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02023 (22) 国際出願日 2000年3月30日(30.03.00) (30) 優先権データ 特願平11/91408 1999年3月31日(31.03.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 学校法人 慶應義塾(KEIO UNIVERSITY)[JP/JP] 〒108-8345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 天谷雅行(AMAGAI, Masayuki)[JP/JP] 西川武二(NISHIKAWA, Takeji)[JP/JP] 鈴木春巳(SUZUKI, Harumi)[JP/JP] 小安重夫(KOYASU, Shigeo)[JP/JP] 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: AUTOIMMUNE DISEASE MODEL ANIMAL (54) 発明の名称 自己免疫疾患モデル動物 (57) Abstract Pemphigus vulgaris (PV) is an autoimmune disease with a possible fatality of the skin and mucosae which is induced by an antibody against desmoglein 3 (Dsg3). Persistent production of anti-Dsg3 IgG can be induced by adoptively transferring spleen cells of a DSG3-/-mouse immunized with rDsg3 into an RAG2-/-immunodeficient mouse expressing Dsg3 protein. This IgG in the blood binds to the Dsg3 protein <i>in vivo</i> , induces the breakage of intercellular adhesion of keratinocytes and thus brings about the phenotype of pemphigus vulgaris involving the formation of water vacuoles in the oral mucosa and the disappearance of resting hair. These effects are sustained over 6 months. By using this method, active disease model animals relating to various autoimmune diseases can be constructed.		

(57)要約

尋常性天疱瘡 (PV) は、デスモグレイン 3 (Dsg3) に対する抗体により引き起こされる致命的となりうる皮膚及び粘膜の自己免疫疾患である。rDsg3 で免疫した DSG3-/-マウスの脾細胞を、Dsg3 タンパク質を発現する RAG2-/-免疫不全マウスへと養子移入すると、永続的な抗 Dsg3 IgG の産生が起こった。このような血中 IgG は、インビボで Dsg3 タンパク質に結合し、ケラチノサイトの細胞間接着の破壊を引き起こし、口腔粘膜内の水疱形成及び休止期毛の消失を含む、尋常性天疱瘡表現型をもたらした。これは、6 ヶ月以上にわたり持続した。本発明の方法を利用すれば、種々の自己免疫疾患に関する活性疾患動物モデルを作製することが可能である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

自己免疫疾患モデル動物

技術分野

本発明は、自己免疫疾患のモデル動物およびその作製方法に関する。

背景技術

尋常性天疱瘡 (pemphigus vulgaris; PV) は、時として致命的となる皮膚及び粘膜の自己免疫水疱形成疾患であり、組織学的には表皮内の水疱形成により特徴付けられ、免疫病理学的にはケラチノサイトの細胞表面に対する IgG 自己抗体により特徴付けられる (Stanley, J.R. Pemphigus. In *Dermatology in General Medicine*. I.M. Freedberg, A. Z. Eisen, K. Wolff, K.F. Austen, L.A. Goldsmith, S.I. Katz, and T.B. Fitzpatrick, eds. McGraw-Hill, New York, 654-666 (1998))。臨床的には、尋常性天疱瘡患者は、広範な弛緩性の水疱及びびらんを示す。これらは、あらゆる重層扁平上皮に生じうる。適当な治療を行わなければ、広範囲の皮膚に生じた病巣が体液の病出又は二次的な細菌感染を引き起こすため、尋常性天疱瘡は致命的となることもある。コルチコステロイドの全身投与及び免疫抑制療法を用いることにより、天疱瘡の予後は改善されているが、治療の合併症による死亡のため、死亡率は依然としてかなり高い。

尋常性天疱瘡の標的抗原は、最初、ケラチノサイト抽出物の免疫沈降により、130kD の糖タンパク質として同定された (Stanley, J.R. et al., *J. Clin. Invest.* 70:281-288 (1982); Stanley, J.R. et al., *J. Clin. Invest.* 74:313-320 (1984))。その後、尋常性天疱瘡抗原に特異的なアフィニティ精製自己抗体を用いてヒト・ケラチノサイト発現ライブラリーを免疫スクリーニングするこ

とにより、尋常性天疱瘡抗原の cDNA が単離された (Amagai, M. et al., Cell 67:869-877 (1991))。塩基配列の解析により、尋常性天疱瘡抗原は、細胞間接着分子のカドヘリン・スーパー遺伝子ファミリーに属することが示された。尋常性天疱瘡抗原は、デスモソームの膜タンパク質であり (Karpati, S. et al., J. Cell Biol. 122:409-415 (1993))、デスモグレイン 3 (desmoglein3/Dsg3) と名付けられた (Amagai, M. Adv. Dermatol. 11:319-352 (1996))。

Dsg3 タンパク質に対する IgG 自己抗体が尋常性天疱瘡の病因的役割を示す証拠は多数存在する。第一に、経時的な疾患の活性が、血中抗体力価と相関していることが、間接蛍光抗体法 (Sams Jr, W.M. & Jordon, R.E., Br. J. Dermatol. 84:7-13 (1971)) 又は ELISA (Ishii, K., et al., J. Immunol. 159:2010-2017 (1997); Amagai, M., et al., Br. J. Dermatol. 140:351-357 (1999)) により報告されている。第二に、尋常性天疱瘡を患う母親の新生児は、胎盤を介して移行した母親由来の IgG のために一時的に疾患を有する (Merlob, P. et al., Pediatrics 78:1102-1105 (1986))。母親由来の IgG が異化されるにつれ、症状は軽快する。第三に、尋常性天疱瘡患者由来の IgG は、組織培養された皮膚において、補体又は炎症細胞なしに水疱形成を誘導することができる (Schiltz, J.R., & Michel, B., J. Invest. Dermatol. 67:254-260 (1976); Hashimoto, K. et al., J. Exp. Med. 157:259-272 (1983))。第四に、患者の血清由来の IgG を新生マウスに受動移入すると、典型的な組織学的所見を伴う表皮内水疱形成が起こる (Anhalt, G.J. et al., N. Engl. J. Med. 306:1189-1196 (1982))。第五に、患者の血清を、細胞外ドメインからなる組換え Dsg3 タンパク質 (rDsg3) を用いて免疫吸収除去すると、血清の病原性が除去され、新生マウスにおける水疱形成が阻害される (Amagai, M. et al., J. Clin. Invest. 94:59-67 (1994))。最後に、rDsg3 でアフィニティ精製された抗体は、病原性を有し、新生仔マウスにおいて尋常性天疱瘡の組織学的所見を伴う水疱を形成させる (A

magai, M. et al., J. Clin. Invest. 90:919-926 (1992); Amagai, M. et al., J. Clin. Invest. 102:775-782 (1998))。

これらの研究から、尋常性天疱瘡は、特に自己抗体生成後の過程に関しては、最もよく特徴が決定された自己免疫疾患の一つとなっている。従って、尋常性天疱瘡は、現在では、自己抗体産生又は自己寛容の破壊の細胞メカニズムを研究するため、また、疾患特異的な治療法を開発するための、組織特異的自己免疫疾患の良い疾患モデルである。これらの目標に達するための第一段階として、尋常性天疱瘡の活性疾患動物モデルの開発が必要である。

実験的自己免疫疾患動物モデルの大部分は、様々なアジュバントを用いて自己抗原を繰り返し注射することにより作製されている。しかし、重症筋無力症の場合のように、アセチルコリン・レセプター (T.カリフォルニカ (T.californica)) で免疫されたマウスに活性な疾患が発生する頻度は系統により極めて異なるため、この方法は、非常に経験に頼ったものである (Berman, P.W. et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 377:237-57 (1981))。

過去に、重症複合免疫不全 (SCID) マウスを尋常性天疱瘡患者由来の PBMC で再構築することにより、尋常性天疱瘡のインビボ実験モデルが開発された (Juhász, I. et al., J. Clin. Invest. 92:2401-7 (1993))。このモデルでは、患者由来のリンパ球が低力価の血中自己抗体を産生したが、マウス皮膚にヒト IgG 沈着を伴う自発的な表皮内水疱が見られることは稀であった。ヒトの皮膚を SCID マウスに移植した場合には、移植された皮膚に尋常性天疱瘡様の水疱が見られたが、このモデルにおける水疱発生の原因は、ヒトの PBMC 及び皮膚の組織不適合による炎症反応である可能性も否定できていない。このように、確実な尋常性天疱瘡の活性疾患モデルは存在していなかった。

発明の開示

本発明は、自己免疫疾患のモデル動物およびその作製方法を提供する。より詳しくは、自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する T 細胞や B 細胞の活性化とそれに伴う自己抗体の安定的な産生が誘導され、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物およびその作製方法を提供する。好ましい態様において、該モデル動物は、自己免疫疾患の抗原タンパク質に対する抗体を産生する B 細胞、および/または抗原タンパク質に反応する T 細胞を含む免疫担当細胞の移植により作製される。

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、従来一般的に用いられてきた反復注射法を採用して、マウス内における自己抗体の産生を試みた。具体的には、3 系統のマウス、BALB/c (H-2^d)、C3H/HeJ (H-2^k)、及び C57BL/6N (H-2^b) をヒト又はマウスの Dsg3 タンパク質で免疫した。初回免疫においては完全フロイント・アジュバントを用い、その後は、不完全フロイント・アジュバントを用いて 3 又は 7 回追加免疫を行った。しかしながら、この方法では、いずれのマウスもマウス Dsg3 タンパク質に反応することができる抗体を産生せず（表 1）、尋常性天疱瘡の表現型を全く発現しなかった。

この結果に基づき、本発明者らは、マウス体内において病原性抗体が産生されないのは、Dsg3 タンパク質に対する自己寛容のためであるとの仮説をたてた。この仮説に基づけば、遺伝子ターゲティング技術により作製した Dsg3 欠損マウスは発生段階で免疫系が Dsg3 タンパク質に曝されず、Dsg3 タンパク質に対する自己寛容を獲得していないと考えられる。

本発明者らは、この仮説を証明するために、Dsg3 欠損マウスに対して Dsg3 タンパク質を免疫して、Dsg3 タンパク質に対する抗体を産生するか否かの検討を行った。その結果、Dsg3 タンパク質の免疫により、DSG3 遺伝子をホモで欠損している DSG3^{-/-}マウスでは、DSG3 遺伝子をヘテロで欠損している DSG3^{+/-}マウスと比較して、はるかに効率的な抗体の産生が検出された（図 1A）。また、DSG3^{-/-}マウスにおいて産生された抗体は、ケラチノサイト上のマウス Dsg3 タンパク

質に結合することができたが、DSG3+/-マウスの抗体は結合できなかった（図 1 B）。即ち、DSG3-/-マウスにおいては、DSG3 タンパク質に対する自己寛容が成立しておらず、産生された抗体がマウス Dsg3 タンパク質を抗原として認識することが判明した。

そこで、本発明者らは、次に、Dsg3 タンパク質で免疫した DSG3-/-マウスから脾細胞（DSG3 タンパク質に対する抗体の産生能を有する）を取り出し、これを RAG2-/-免疫不全マウスに養子移入して、該マウス内での Dsg3 タンパク質に対する抗体の産生および尋常性天疱瘡の表現型の発現を試みた。RAG2-/-マウスは、Dsg3 タンパク質を発現しているが、T 細胞レセプター又は免疫グロブリンの遺伝子を再編成することができないため、これらのマウスには成熟 T 又は B 細胞が存在しない（即ち、免疫不全となっている）。

その結果、DSG3-/-マウスの脾細胞が移植された RAG2-/-マウスでは、脾細胞に含まれる Dsg3 タンパク質に特異的なリンパ球が内因性の Dsg3 タンパク質に結合し、これにより Dsg3 タンパク質に対する抗体が永続的に産生された（図 2 A）。また、免疫された DSG3-/-脾細胞をもつ RAG2-/-マウスは、DSG3-/-マウスとほぼ同一の表現型を示すことが見出された（Koch, P.J., et al., J. Cell Sci. 111:2529-2537 (1998); Koch, P.J., et al., J. Cell Biol. 137:1091-1102 (1997)）。いずれのマウスも、粘膜のびらん性損傷、皮膚の基底上棘融解、休止期毛の消失を示した（図 3）。DSG3-/-脾細胞の養子移入により RAG2-/-受容マウスにおいてほぼ同一の表現型が再現したことは、産生された抗体が特異的かつ病原性であることを証明するものである。

この抗体の特異性は、Dsg2 タンパク質を発現している他の単層上皮（Schafer, S. et al., Exp. Cell Res. 211:391-9 (1994)）、又は Dsg1 タンパク質を発現している表皮の上部（図 3G）（Amagai, M. et al., J. Invest. Dermatol. 106:351-355 (1996)）には、インビボの沈着が見られないことから裏付けられる。

このように、本発明は、天疱瘡の最初の疾患マウスモデルおよびその作製方法を提供するものである。本発明の方法は、その性質上、自己抗体の標的が同定されている他の自己免疫疾患のモデル動物の作製に広く応用することが可能である。

従って、本発明は、自己免疫疾患のモデル動物およびその作製方法に関し、より具体的には、

(1) 自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生または T 細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物、

(2) 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物の免疫担当細胞が移植されている、(1) に記載の非ヒト哺乳動物、

(3) 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を抗原タンパク質で免疫し、その免疫担当細胞が移植されている、(1) に記載の非ヒト哺乳動物、

(4) 免疫担当細胞の移植が、免疫不全非ヒト哺乳動物に対して行われている、(2) または (3) に記載の非ヒト哺乳動物、

(5) 免疫不全非ヒト哺乳動物が、RAG2 遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物である、(4) に記載の非ヒト哺乳動物、

(6) 免疫担当細胞が脾細胞である、(2) から (5) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物、

(7) 自己免疫疾患が尋常性天疱瘡である、(1) から (6) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物、

(8) 抗原タンパク質がデスモグレイン 3 タンパク質である、(7) に記載の非ヒト哺乳動物、

(9) げっ歯類である、(1) から (8) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物、

(10) マウスである、(9) に記載の非ヒト哺乳動物、

(11) 自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生またはT細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を自己免疫疾患の抗原タンパク質で免疫する工程、

(b) 該非ヒト哺乳動物から免疫担当細胞を調製する工程、および

(c) 該免疫担当細胞を抗原タンパク質を有する非ヒト哺乳動物に移植する工程、を含む方法、

(12) 免疫担当細胞の移植が、免疫不全非ヒト哺乳動物に対して行われている、(11)に記載の方法、

(13) 免疫不全非ヒト哺乳動物が、RAG2 遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物である、(12)に記載の方法、

(14) 免疫担当細胞が脾細胞である、(11)から(13)のいずれかに記載の方法、

(15) 自己免疫疾患が尋常性天疱瘡である、(11)から(14)のいずれかに記載の方法、

(16) 抗原タンパク質がデスモグレイン3タンパク質である、(15)に記載の方法、

(17) 非ヒト哺乳動物がげっ歯類である、(11)から(16)のいずれかに記載の方法、

(18) げっ歯類がマウスである、(17)に記載の方法、に関する。

本発明のモデル動物は、自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の安定的な産生、またはT細胞の持続的な活性化により、自己免疫疾患の表現型を示すことができる。

本発明においてモデル動物の作製を行うための対象疾患としては、自己免疫疾患であれば特に制限はない。自己免疫疾患としては、例えば、尋常性天疱瘡、重

症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、バセドー病、橋本病、グットパスチャー症候群、自己免疫性糖尿病、多発性硬化症などが挙げられるが、これらに制限されない。

モデル動物の作製に用いられる動物は、好ましくは非ヒト哺乳動物である。非ヒト哺乳動物としては、遺伝子欠損動物を作製しうるものであれば制限はない。好適な動物としては、げっ歯類、例えば、マウスが挙げられる。

本発明のモデル動物は、抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を自己免疫疾患の抗原タンパク質で免疫し、その免疫担当細胞を摘出し、これを該抗原タンパク質を有する他の非ヒト哺乳動物に移植することにより作製することができる。

抗原遺伝子を欠損した動物の作製は、当業者に公知の方法で行うことができる。欠損させる抗原遺伝子としては、例えば、自己免疫疾患が尋常性天疱瘡であれば DSG3 遺伝子、重症筋無力症であればアセチルコリン受容体遺伝子、バセドー病や橋本病であれば TSH 受容体遺伝子、グットパスチャー症候群であれば IV 型コラーゲン遺伝子、多発性硬化症であればミエリン塩基性蛋白質遺伝子などが挙げられるが、これら例示したものに制限されない。

また、免疫担当細胞の摘出は、胸腺、リンパ節、脾臓、肝臓、腸管上皮、抹消血などから行なうことができるが、これらに制限されない。成熟した免疫担当細胞が多く含まれる脾臓は、免疫担当細胞を摘出するための好適な臓器である。免疫担当細胞を調製するための動物（ドナー）と免疫担当細胞の移植を受ける動物（レシピエント）は、移入される免疫担当細胞由来のリンパ球がレシピエントの組織を破壊する GVHD が発症しないようにするために、同種であり、遺伝子背景が同じであることが好ましい。

また、レシピエントは、移入された免疫担当細胞由来のリンパ球を拒絶しないようにするために、免疫不全であることが好ましい。免疫不全動物としては、RAG2 遺伝子が欠損した動物以外に、例えば、SCID マウス、ヌードマウスを用い

ることも考えられる。また、MHC ノックアウトマウスや共通 γ 鎖ノックアウトマウスなどを用いることも考えられるが、これらに制限されない。

ドナーの抗原タンパク質での免疫、ドナーからの免疫担当細胞の調製、およびレシピエントへの免疫担当細胞の移植は、例えば、実施例に記載の方法により行うことができる。

調製された本発明のモデル動物は、自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の安定的な産生、または T 細胞の持続的な活性化により、自己免疫疾患の表現型を示すことができる。尋常性天疱瘡のモデル動物においては、主要な表現型として体重減少及び可逆的な脱毛などを示す。また、尋常性天疱瘡以外の自己免疫疾患では、重症筋無力症では筋力低下、自己免疫性溶血性貧血では貧血、バセドー病では甲状腺機能亢進、橋本病では甲状腺機能低下、グットパスチャー症候群では腎障害や肺障害、自己免疫性糖尿病では糖尿、多発性硬化症では神経麻痺などの表現型を示すと考えられる。

これらのモデル動物は、自己免疫疾患の治療効果を検討したい所望の化合物を投与し、その表現型を観察することにより、該疾患に対する治療薬や治療法の開発に用いることができる。特に、本実施例において作製された尋常性天疱瘡のモデルマウスは、その主要な表現型が体重減少及び可逆的な脱毛であり、また表現型が 6 か月以上に亘って持続するため、該マウスを屠殺することなく観察してそれぞれの治療薬や治療法の有効性を容易かつ客観的に評価することが可能である。また、これらのモデルマウスは、抗原タンパク質に対する抗体産生の細胞メカニズムを解明する上でも非常に有用である。

図面の簡単な説明

図 1 は、DSG3^{-/-}マウスにおける、インビボで結合できる抗 Dsg3 IgG の産生を示す図 (A) および写真 (B) である。(A) DSG3^{-/-}マウス及びその +/- 同腹マウスをマウス rDsg3 で免疫し、抗 Dsg3 IgG の力価を経時的に ELISA で測定した。

矢印は、完全フロイント・アジュバントを用いたマウス rDsg3 による最初の免疫を示し、矢尻は不完全フロイント・アジュバント用いたマウス rDsg3 による追加免疫を示す。DSG3^{-/-}マウスは、+/-同腹マウスよりもはるかに効率よく抗 Dsg3 IgG を産生した。(B) 免疫された DSG3^{-/-}マウス (a) 由来の血清により、培養ケラチノサイトの細胞間接触部位が染色されたが、+/-同腹マウス (b) 由来の血清では染色されなかった。バーは 50 μ m を表す。

図 2 は、免疫された DSG3^{-/-}脾細胞の移入後、受容 RAG2^{-/-}マウスにおいて抗 Dsg3 IgG が産生されたことを示す図である。(A) 免疫された DSG3^{-/-}マウスの脾細胞を受容した RAG2^{-/-}マウス [RAG2^{-/-}(DSG3^{-/-})] 又は DSG3^{+/-}マウスの脾細胞を受容した RAG2^{-/-}マウス [RAG2^{-/-}(DSG3^{+/-})] で、マウス rDsg3 に対する ELISA スコアを得た。DSG3^{-/-}脾細胞をもつ RAG2^{-/-}マウスは、持続的な抗 Dsg3 IgG 産生を示した。矢印は、脱毛表現型が出現した日を示す。対照的に、DSG3^{+/-}脾細胞をもつ RAG2^{-/-}マウスに関する ELISA は、いずれの時点においても陰性のままであった。(B) 受容 RAG2^{-/-}マウスの体重変化を経時的にプロットした。DSG3^{-/-}脾細胞をもつ RAG2^{-/-}マウスでは、10~14 日目に、DSG3^{+/-}脾細胞をもつマウスと比較して体重増加が遅れ始め、その後体重が減少し続けた。数匹は死亡し (†)、数匹は生き残り、その後体重を増やした。

図 3 は、免疫された DSG3^{-/-}脾細胞を移入された RAG2^{-/-}マウスは、尋常性天疱瘡の表現が見られたことを示す写真である。脾細胞の移入の 7~14 日後付近に、DSG3^{-/-}脾細胞をもつ RAG2^{-/-}マウス (A、下) では、DSG3^{+/-}脾細胞をもつマウス (A、上) と比較して体重減少が認められた。数匹は、マウスが掻破する鼻及び頬の周辺に、痂皮のあるびらんを発症した (B)。DSG3^{-/-}脾細胞をもつ RAG2^{-/-}マウスの組織診により、粘膜上皮の基底層直上に表皮内水疱形成が明らかになった (C、硬口蓋；D、食道上部)。びらん病巣の下には炎症性浸潤物が認められた (E、食道上部)。直接蛍光抗体法により、粘膜上皮 (F、硬口蓋)

及び皮膚（G、鼻周辺）に、ケラチノサイト細胞表面上のインビボの IgG 沈着が認められた（図の白い部分）。バーは 50 μ m を示す。

図 4 は、免疫された DSG3^{-/-}脾細胞を移入された RAG2^{-/-}マウスは、DSG3^{-/-}マウスに見られるのと同様な、脱毛表現型が見られたことを示す写真である。移入の 15～25 日後付近に、DSG3^{-/-}脾細胞をもつ RAG2^{-/-}マウスは部分的な脱毛を示した（A、B）。粘着テープによるヘア・プル・テストで、DSG3^{-/-}脾細胞をもつ RAG2^{-/-}マウスでは毛の集塊がテープに付着したが（C、左）、DSG3^{+/+}脾細胞をもつ RAG2^{-/-}マウスでは毛が付着しないことが示された（C、右）。その後、無毛領域に新たな毛がモザイク状に再生した（D、矢印）。組織診により、毛球部の細胞と、外毛根鞘上皮の基底層との間の棘融解（E、矢印）、及び空の膨張した休止期毛包（F、矢印）が示された。直接蛍光抗体法、毛根部のケラチノサイトの細胞表面にはインビボの IgG 沈着が見られた（G、H）（図の白い部分）。バーは 50 μ m を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例 1】 組換えマウス Dsg3 タンパク質の製造

マウス Dsg3 の全細胞外ドメインをコードする cDNA (Genbank U86016) を、適当なプライマー (5'-CCGAGATCTCCTATAAAATATGACCTGCCTCTCCCTAGA-3' / 配列番号：1、5'-CGGGTCGACCCTCCAGGATGACTCCCCATA-3' / 配列番号：2) を用いて、マウス Dsg3 cDNA を含むファージクローン (Dr. Jouni Uitto より譲り受けた) を鋳型として PCR 増幅し、増幅断片を pEVmod-Dsg3-His ベクター (Ishii, K., et al., J. Immunol. 159:2010-2017 (1997)) 中のヒト Dsg3 cDNA と入れかえることによりサブクローニングした (pEVmod-mDsg3-His)。組換えバキュロタンパク質、マウス rDsg3 は、以前の記載のようにして調製した (Amagai, M. et

al., J. Clin. Invest. 94:59-67 (1994); Amagai, M. et al., J. Invest. Dermatol. 104:895-901 (1995))。

〔実施例 2〕 DSG3+/+野生型マウスにおけるマウス Dsg3 タンパク質の免疫
まず、ヒト又はマウスの rDsg3 の免疫により、様々な野生型マウス系統において Dsg3 タンパク質に対する抗体を産生させようと試みた (表 1)。

マウスを、完全フロイント・アジュバント (CFA) を用いて、5 μ g のマウス又はヒトの精製 rDsg3 を腹腔内注射することにより感作し、その後毎週、3 回または 7 回、不完全フロイント・アジュバント (IFA) を用いて、マウス又はヒトの rDsg3 で追加免疫した。抗体産生は、それぞれの追加免疫の 3 日後に ELISA により試験した。

マウスにおけるマウス Dsg3 タンパク質 (mDsg3) またはヒト Dsg3 タンパク質 (hDsg3) に対する血中 IgG の ELISA による測定は、マウスまたはヒト rDsg3 をコーティング用抗原として用いた。具体的に説明すると、マイクロタイター 96 穴プレートを、4°C で一晩、100 μ l の 5 μ g/ml の精製マウスまたはヒト rDsg3 でコーティングした。全ての血清試料を 50 から 5,000 倍に希釈し、室温で 1 時間、96 穴 ELISA プレート上でインキュベートした。ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス IgG 抗体 (MBL, Nagoya, Japan) と共に室温で 1 時間インキュベートした後、1mM のテトラメチルベンジジンをペルオキシダーゼの基質として用い、発色させた (Ishii K et al., J Immunol 159: 2010-2017, 1997、Amagai M et al., Br J Dermatol 140:351-357, 1999)。各試料をデュプリケートで分析した。マウス rDsg3 で免疫された DSG3-/-マウスから得られた単一の血清試料を陽性対照として用い、免疫されていないマウス由来の血清を陰性対照として用いた。ELISA スコアは、 $[(\text{試料の OD} - \text{陰性対照の OD}) / (\text{陽性対照の OD} - \text{陰性対照の OD}) \times 100]$ で計算される指数として得た (表 1)。

さらに、Dsg3 タンパク質に対する抗体産生を、培養ケラチノサイトの免疫蛍光染色により試験した。マウス・ケラチノサイト細胞株 PAM212 (Yuspa, S.H. e

t al., Cancer Res. 40:4694-4703 (1980)) 又はヒト・ケラチノサイト細胞株 KU8 (Tsukamoto, T., Keio J. Med. 38:277-293 (1989)) を、37°Cで、5%CO₂を含む加湿空気中で、30 分間、10%FCS を含む DMEM で 20 倍に希釈したマウス血清試料と共にインキュベートした。次に、PBS(-)で洗浄した後、-20°Cで 20 分間、細胞を 100%メタノールで固定化し、フルオレセイン・イソチオシアネート (FITC) 結合ヤギ抗マウス IgG 抗体 (DAKO, Copenhagen, Denmark) と共に室温で 30 分間インキュベートした。染色は、蛍光顕微鏡 (Nikon, Eclipse E800) で観察した。

C57BL/6N マウス又は BALB/c マウスを、完全フロイント・アジュバント、次に不完全フロイント・アジュバントを用いてヒト rDsg3 で免疫した場合、これらのマウスは、ヒト rDsg3 とのみ反応し、マウス rDsg3 とは反応しない IgG を産生することが、ELISA 及び免疫蛍光染色により決定された。C3H/HeJ マウスのみが ELISA でマウス rDsg3 に対する弱い交叉反応性を示す IgG を産生した。これらの 3 系統のマウスをマウス rDsg3 で免疫した場合には、いずれのマウスも、用いた 3 つの方法 (ELISA、間接蛍光抗体法、生ケラチノサイト染色(living keratinocyte staining)) いずれによっても、マウス又はヒトの rDsg3 を認識する IgG を産生しなかった。これらの知見から、DSG3+/+野生型マウスは Dsg3 に対する免疫寛容を有しており、DSG3+/+野生型マウスにマウス Dsg3 に対する抗体を産生させるのは困難であることが示唆された。

表 1

マウス系統	n	抗原 ^a	CFA	IFA ^b	ELISA ^c		IIF ^d		生細胞染色 ^e	
					mDsg3	hDsg3	NMS	NHS	Pam	KU8
C57BL/6N	2	hDsg3	1	3	18.4	93.4	—	+	—	+
BALB/c	3	hDsg3	1	3	6.3	85.4	—	+	—	+
C3H/HeJ	2	hDsg3	1	3	47.5	167.7	—	+	—	+
C57BL/6N	3	mDsg3	1	7	10.6	10.1	—	—	—	—
BALB/c	3	mDsg3	1	7	1.7	2.3	—	—	—	—
C3H/HeJ	3	mDsg3	1	7	5.4	7.5	—	—	ND	ND

表 1 中、抗原の欄には、組換えヒト Dsg3 を用いた場合は「hDsg3」、組換えマウス Dsg3 を用いた場合は「mDsg3」で示した (a)。「CFA」は、完全フロイント・アジュバント (CFA) を用いた精製マウスまたはヒト組換え Dsg3 の免疫回数を、また、「IFA」は、その後毎週行った、不完全フロイント・アジュバント (IFA) を用いた追加免疫 (ブースト) の回数 (3 回または 7 回) を表す (b)。ELISA スコアはヒト組換え Dsg3 (hDsg3) またはマウス組換え Dsg3 (mDsg3) に対して算出した (c)。20.0 より大きければ陽性と判断される。表中の「IIF」は、マウス血清を用いて、正常マウス皮膚 (NMS) または正常ヒト皮膚 (NHS) の間接蛍光抗体染色 (IIF) を行った結果を示す (d)。また、表中の「生細胞染色」は、マウス血清を用いて、培養マウス・ケラチノサイト細胞株 (Pam) またはヒト・ケラチノサイト細胞株 (KU8) の生細胞染色を行った結果を示す (e)。「-」は陰性を、「+」は陽性を表す。「ND」は試験していないことを示す。

【実施例 3】 DSG3^{-/-}マウスおよび DSG3^{+/-}マウスにおけるマウス Dsg3 タンパク質の免疫

DSG3^{-/-}マウスは、雄 DSG3^{-/-}マウスと雌 DSG3^{+/-}マウスの交配により得た (Koch, P.J., et al., J. Cell Biol. 137:1091-1102 (1997))。また、B6.SJL-ptpr^cに 10 世代にわたり戻し交配させた RAG2^{-/-}マウスは、タコニック社 (Taco

nic) (German Town, NY) より入手した (Schulz, R.-J. et al., J. Immunol. 157:4379-4389 (1996))。

DSG3^{-/-}マウスには Dsg3 タンパク質に対する免疫寛容がないことを確認するため、DSG3^{-/-}マウスをマウス rDsg3 で免疫し、マウス rDsg3 に対する ELISA スコアを測定した。

DSG3^{-/-}マウス及び DSG3^{+/-}マウスを、完全フロイント・アジュバントを用いて、5 μ g の精製マウス rDsg3 で感作し (0 日目)、その後、8、15、22、および 28 日目に、不完全フロイント・アジュバントを用いて、マウス rDsg3 で追加免疫した。抗体産生は、マウス rDsg3 をコーティング用抗原として用いて、実施例 2 と同様の ELISA により測定した。

DSG3^{-/-}マウス (n=4) では、早くも 11 日目に抗 Dsg3 IgG の産生が観察され、その後その力価は増加し続けた (図 1A)。DSG3^{+/-}マウスを繰り返し免疫すると、最終的には ELISA 力価が増加したが、その力価は 32 日目の DSG3^{-/-}マウスの力価より有意に低かった ($p < 0.0001$)。

これらのマウスで産生された抗 Dsg3 IgG が、インビボでケラチノサイト上の Dsg3 タンパク質に結合することができるか否かを決定するため、マウス・ケラチノサイト細胞株 Pam212 を用いて実施例 2 と同様に生体染色を行った。DSG3^{-/-}マウス由来の血清を培養培地に添加すると、それらの血清は培養ケラチノサイトの細胞間接着部位に結合したが、DSG3^{+/-}マウス由来の血清は細胞表面の染色を全く示さなかった (図 1B)。免疫された DSG3^{+/-}マウスの表皮にはインビボの IgG 沈着は見られなかった。従って、DSG3^{+/-}マウスで産生された抗体は、精製マウス rDsg3 中の微量混入成分、マウス rDsg3 の C 末端のタグ、又はインビボの条件では到達できないマスキングされた Dsg3 エピトープに対して産生されたものである可能性が極めて高い。

これらの結果から、DSG3^{-/-}マウスには Dsg3 に対する免疫寛容がなく、マウス rDsg3 で DSG3^{-/-}マウスを免疫することにより、Dsg3 の接着機能を阻害する病原性 IgG が産生されることが示唆された。

〔実施例 4〕 受容 RAG2^{-/-}マウスにおける病原性抗 Dsg3 IgG の永続的な産生 DSG3^{-/-}マウスは標的抗原を欠損しているため、DSG3^{-/-}マウスでは抗 Dsg3 IgG により表現型が変化しないと予想された。そこで、免疫された DSG3^{-/-}マウス又は DSG3^{+/+}マウスの脾細胞を RAG2^{-/-}免疫不全マウスに移入する実験を行った。RAG2^{-/-}マウスは、Dsg3 タンパク質を発現しているが、T 細胞レセプター又は免疫グロブリンの遺伝子を再編成することができないため、これらのマウスには成熟 T 又は B 細胞が存在しない。そのため、移入した脾細胞が拒絶されず、受容マウスで抗 Dsg3 IgG が産生されと考えられる。

DSG3^{-/-}マウス及び DSG3^{+/+}マウスを、完全フロイント・アジュバントを用いて、5 μ g の精製マウス rDsg3 で感作し（0 日目）、その後、7 日目及び 14 日目に、不完全フロイント・アジュバントを用いて、マウス rDsg3 で追加免疫した。抗体産生は、18 日目に実施例 2 と同様の ELISA により確認した。最後に、アジュバントを用いずにマウス rDsg3 で追加免疫し、追加免疫の数日後に、免疫担当細胞として脾細胞を調製するためマウスを屠殺した。

脾細胞の養子移入にあたっては、単核細胞を、DSG3^{-/-}マウス又は DSG3^{+/+}マウスの脾臓から単離し、10%ウシ胎児血清、0.21%重炭酸ナトリウム溶液（w/v）、2mM L-グルタミン（GIBCO）、及び抗生物質を含む完全培地 RPMI1640（Nissui Pharmaceuticals, Tokyo）に再懸濁させた。約 1×10^7 個の脾細胞を PBS に懸濁させ、尾静脈への静脈注射により RAG2^{-/-}マウスに移入した。抗体産生は、マウス rDsg3 をコーティング用抗原として用いて、実施例 2 と同様の ELISA により測定した。

DSG3^{-/-}脾細胞を移入してから早くも 4 日目には受容 RAG2^{-/-}マウスの血中に抗 Dsg3 IgG が検出された。抗体産生は迅速に増加し、21 日目付近でプラトーに

達し、その後永続的に持続した ($n=13$) (図 2A)。持続的な抗体産生は、6 ヶ月以上にわたり、マウスが生存している限り観察された。対照的に、DSG3+/-マウス脾細胞を移入された RAG2-/-マウスの血中には、いずれの時点においても抗 Dsg3 IgG が検出されなかった ($n=5$) (図 2A)。

抗 Dsg3 IgG 産生 B 細胞の局在を調べるため、以下のようにして ELISPOT アッセイを行った。PVDF 底 96 穴マイクロタイター・プレート (Millipore-Amicon, Beverly, MA) を、 $30 \mu\text{g/ml}$ のマウス rDsg3 でコーティングした。再構築された RAG2-/-マウスの末梢血、脾臓、骨髓、及びリンパ節から調製された単核細胞を、 37°C で、 $5\%\text{CO}_2$ を含む加湿空気中で、4 時間、プレート上でインキュベートした。アルカリホスファターゼ結合抗マウス IgG 抗体 (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA) を用いて、メンブレンに結合した IgG をスポットとして可視化した。スポットの数を実体顕微鏡下で計数し、抗 mDsg3 IgG 産生 B 細胞の頻度を、単核細胞 10^5 個当たりの数として決定した。全ての実験はトリプリケートで行った。アッセイの結果検出された、抗 Dsg3 IgG 産生 B 細胞の数を表 2 に示す。

抗 Dsg3 IgG 産生 B 細胞は、養子移入の初期 (22 日目) にも後期 (117 日目) にも受容 RAG2-/-マウスの脾臓及びリンパ節に主に局在していることが判明した (表 2)。表中、免疫された DSG3-/-マウスの脾細胞を移入された RAG2-/-マウスは「+」で、移入されていないマウスは「-」で表した(a)。また、「日数」は移入から屠殺までの日数を表す(b)。また、抗 mDsg3 IgG 産生 B 細胞の数は、単核細胞 10^5 個当たりの数として示されている(c)。脾臓における抗 Dsg3 IgG 産生 B 細胞の頻度は、単核細胞 10^5 個当たり 20 から 100 個の範囲であった。

表 2

マウス	移入 ^a	日数 ^b	脾臓	リンパ節	骨髄	PBMC
RAG#466	-	-	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
RAG#514	+	22	86.5±29.9	13.5±13.6	0.0±0.0	3.8±5.4
RAG#212	+	33	102.1±14.7	47.8±8.8	0.0±0.0	0.0±0.0
RAG#134	+	117	20.8±5.9	16.5±5.9	2.1±2.9	0.0±0.0
RAG#135	+	117	31.3±8.8	27.1±2.9	0.0±0.0	0.0±0.0

〔実施例 5〕 免疫された DSG3-/-脾細胞をもつ RAG2-/-マウスは尋常性天疱瘡の表現型を発現した

免疫された DSG3-/-脾細胞をもつ受容 RAG2-/-マウスにおいて最初に認められた症状として、養子移入の 7～14 日後付近で、DSG3+/-脾細胞をもつマウス (n=5) と比較して体重減少が認められた (n=13) (図 2B 及び 3A)。その後、これらのマウスでは体重が減少し続け、数匹は実際に死亡した。これらのマウスのうち生き残ったものは、後に体重を増やし始めた (図 2B)。体重減少の表現型は、調べた RAG2 受容-/-マウス全てに観察された (n=13)。受容 RAG2-/-マウスのうちの数匹 (n=5) は、掻破を通常行う部位である鼻周辺の皮膚に痂皮のあるびらんを発症した (図 3B)。

表皮 (図 3G、鼻周辺)、口腔粘膜 (図 3F、硬口蓋)、及び食道粘膜を含め、受容 RAG2-/-マウスの重層扁平上皮のケラチノサイト細胞表面には、インビボの IgG 沈着が見られた。数層のケラチノサイトが見られる表皮では、IgG 沈着は下方の層に限定されていたが (図 3G)、口腔及び食道の上皮では上皮全層に IgG が見られた (図 3F)。これらのマウスにおいて、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、小腸、及び大腸を含む他の組織には IgG 沈着が見られなかった。免疫された DSG3-/-脾細胞をもつ RAG2-/-マウスにおける組織診により、頬粘膜、硬口蓋 (図 3

C)、口腔咽頭領域、及び食道上部(図 3D)に、基底層直上の上皮内分裂、即ち、典型的な尋常性天疱瘡所見である基底層直上の棘融解が示された。水疱形成の初期病巣には、有意な炎症細胞浸潤物は本質的に見られなかった(図 3C)。炎症性浸潤物は、古いびらん病巣に主に認められた(図 3E)。ここでは、上皮の障壁機能の消失により食物による刺激及び急性炎症が二次的に引き起こされていた。これらの損傷が、おそらく、これらのマウスの成長阻害をもたらす程に食物摂取を減少させたものと考えられる。

対照的に、免疫された DSG3+/-脾細胞をもつ RAG2-/-マウスには、表現型の変化または病理学的な変化は認められなかった。これらの知見から、免疫された DSG3-/-脾細胞をもつ RAG2-/-マウスは、尋常性天疱瘡の表現型を発現することが示された。

【実施例 6】 免疫された DSG3-/-脾細胞をもつ RAG2-/-マウスは、脱毛表現型を示した

養子移入の 15~25 日後付近に、13 匹の RAG2-/-マウスのうち 11 匹において、部分的な脱毛が認められた(図 2A、矢印参照、図 4A、B)。典型的には、脱毛は小さなスポットとして発生し、次の 2 から 3 週間で次第に周囲へと拡大した。受容 RAG2-/-マウスが 12 週齢以下のとき、額で脱毛が開始し、後方へと進展した。数匹のマウスにおいては、脱毛斑に新たな毛がモザイク状に再生したが、脱毛斑が同スポットとして 1 ヶ月以上残存したマウスや、明確な脱毛斑を形成せずに脱毛が広がったマウスもいた(図 4D)。脱毛斑の隣接領域に粘着テープを貼付し、それを剥離すると(ヘア・プル・テスト(hair pull test))(Koch, P.J., et al., J. Cell Sci. 111:2529-2537 (1998))、毛が塊となりテープに付着した(図 4C)。これらの表現型は、6 ヶ月以上にわたり、血中抗 Dsg3 IgG が存在する限り持続した。

RAG2-/-受容マウスの皮膚の生検により、毛球部(hair club)周辺のケラチノサイトの細胞表面に強い IgG 沈着が示された(図 4G、H)。毛包の IgG 結合の

強度は、表皮よりもはるかに大きかった（図 4G）。皮膚の組織診により、休止期の毛球部周辺の細胞と外毛根鞘の基底層との間の棘融解が示された（図 4E、H、矢印）。脱毛斑には、休止期毛の消失と一致して、空の膨張した休止期毛包が存在した（図 4F）。損傷のない表層の表皮には明白な棘融解はなかった。棘融解を起こした毛包の周辺に、明らかな炎症細胞浸潤は認められなかった（図 4E、F）。

対照的に、DSG3+/-脾細胞を移入された RAG2-/-マウスは、いずれの時点においても、脱毛斑を示さなかった。

産業上の利用の可能性

このモデルの開発により、組織特異的な自己免疫疾患（標的抗原と傷害を起こす抗体あるいは T 細胞の関係が明快になっている自己免疫疾患）に関する研究の新たな方向性が開かれた。本発明のモデルは、特に養子移入の前にリンパ球を操作することにより、自己免疫疾患の抗原タンパク質に対する抗体産生や細胞障害性 T 細胞の誘導などの細胞メカニズムを解明するために有用である。また、このモデルは、新規な疾患特異的な治療法の開発のための貴重な道具ともなる。本発明の尋常性天疱瘡モデル動物においては、主要な表現型が体重減少及び可逆的な脱毛であるため、屠殺することなくマウスを観察することにより、疾患の活性をモニターすることができる。血中抗 Dsg3 抗体の ELISA 力価も、疾患の活性の客観的な指標である。さらに、表現型は、6 ヶ月以上にわたり持続する。従って、それぞれの治療法の有効性を容易に、客観的に評価することができる。さらに重要なことには、本発明の方法は、標的抗原が同定されている、他の組織特異的自己免疫疾患の活性疾患マウスモデルを開発するために応用できる。

請求の範囲

1. 自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生または T 細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物。
2. 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物の免疫担当細胞が移植されている、請求項 1 に記載の非ヒト哺乳動物。
3. 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を抗原タンパク質で免疫し、その免疫担当細胞が移植されている、請求項 1 に記載の非ヒト哺乳動物。
4. 免疫担当細胞の移植が、免疫不全非ヒト哺乳動物に対して行われている、請求項 2 または 3 に記載の非ヒト哺乳動物。
5. 免疫不全非ヒト哺乳動物が、RAG2 遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物である、請求項 4 に記載の非ヒト哺乳動物。
6. 免疫担当細胞が脾細胞である、請求項 2 から 5 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。
7. 自己免疫疾患が尋常性天疱瘡である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。
8. 抗原タンパク質がデスモグレイン 3 タンパク質である、請求項 7 に記載の非ヒト哺乳動物。
9. げっ歯類である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。
10. マウスである、請求項 9 に記載の非ヒト哺乳動物。
11. 自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生または T 細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物の作製方法であって、
 - (a) 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を自己免疫疾患の抗原タンパク質で免疫する工程、
 - (b) 該非ヒト哺乳動物から免疫担当細胞を調製する工程、および

(c) 該免疫担当細胞を抗原タンパク質を有する非ヒト哺乳動物に移植する工程、を含む方法。

12. 免疫担当細胞の移植が、免疫不全非ヒト哺乳動物に対して行われている、請求項11に記載の方法。

13. 免疫不全非ヒト哺乳動物が、RAG2 遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物である、請求項12に記載の方法。

14. 免疫担当細胞が脾細胞である、請求項11から13のいずれかに記載の方法。

15. 自己免疫疾患が尋常性天疱瘡である、請求項11から14のいずれかに記載の方法。

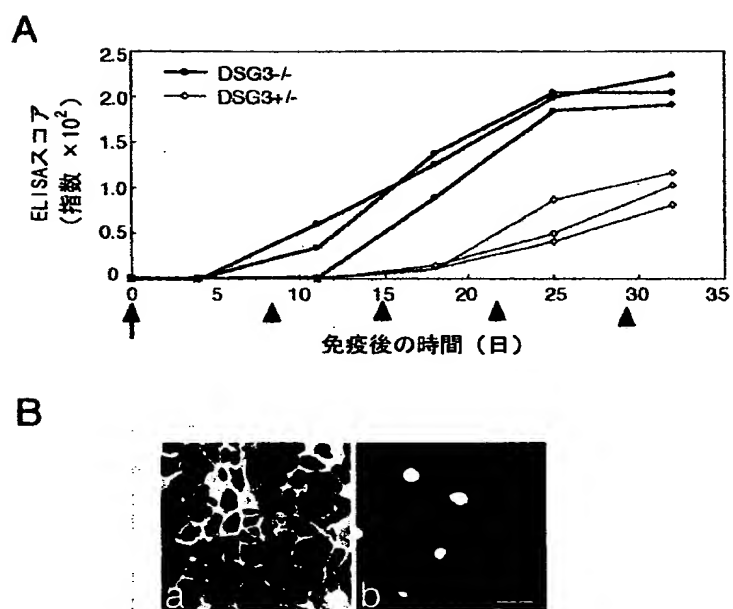
16. 抗原タンパク質がデスモグレイン3タンパク質である、請求項15に記載の方法。

17. 非ヒト哺乳動物がげっ歯類である、請求項11から16のいずれかに記載の方法。

18. げっ歯類がマウスである、請求項17に記載の方法。

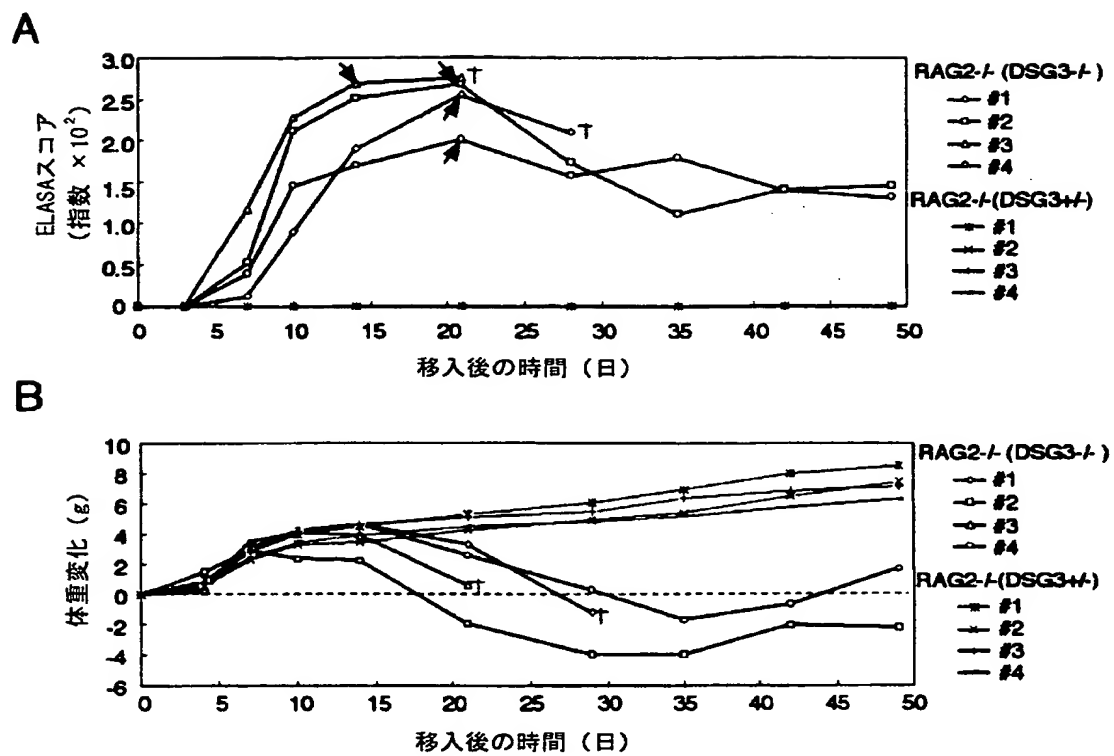
1 / 4

図 1



2 / 4

図 2



3 / 4

図 3

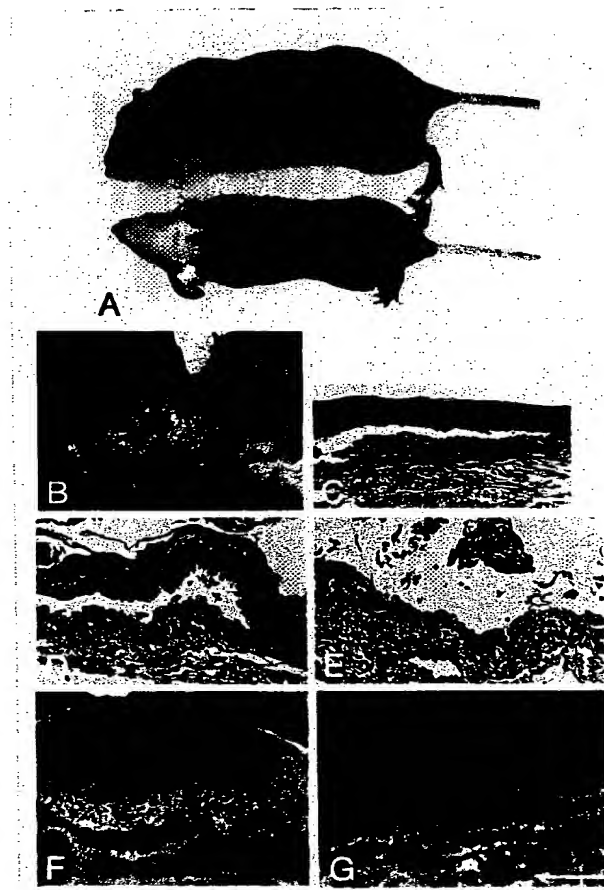
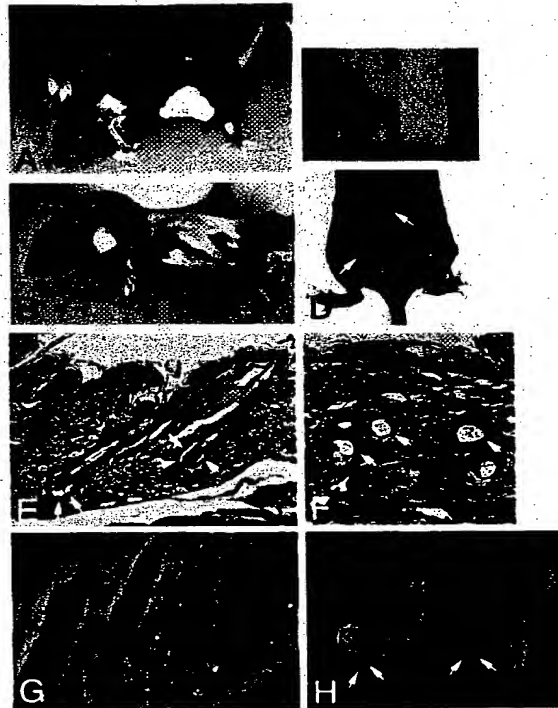


図 4



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Keio University

<120> Methods for development of an active disease
animal model for autoimmune diseases

<130> KUV-101PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-91408

<151> 1999-03-31

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 1

ccgagatctc ctataaatat gacctgcctc ttcctaga

39

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 2

cgggtcgacc ctccaggatg actccccata

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02023

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K 67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K 67/027, C12N 15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Amagai M. et al., Journal of Clinical Investigation, vol.105(5), p.625-631 (2000)	1-18
PX	Fan Ji-Lao et al., Journal of Immunology, vol.153, p.6228-6235 (1999)	1,9,10
X	Takehiro Ono et al., "Igaku no Ayumi", Mar., separate vol., p.282-284 (1995)	1,9,10
Y	Amagai M. et al., Journal of Investigative Dermatology, vol.110(4), p.482 (1998)	7-10,15-18
A	Koch P.J. et al., Journal of Cell Biology, vol. 137(5), p.1091-1102 (1997)	1-18
A	Juhasz I. et al., Journal of Clinical Investigation, vol.92(5), p.2401-2407 (1993)	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"X"

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family

"&"

Date of the actual completion of the international search
27 June, 2000 (27.06.00)Date of mailing of the international search report
11 July, 2000 (11.07.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A01K 67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, C12N 15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Amagai M. et al, Journal of Clinical Investigation, vol.105 (5), p.625-631 (2000)	1-18
PX	Fan Ji-Lao et al., Journal of Immunology, vol.153, p.6228-6235 (1999)	1, 9, 10
X	大野 雄弘ら, 医学のあゆみ, Mar. 別冊, p. 282-284 (1995)	1, 9, 10
Y	Amagai M. et al., Journal of Investigative Dermatology, vol. 110(4), p. 482 (1998)	7-10, 15-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.06.00

国際調査報告の発送日

11.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子

2B

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

PCT


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]REC'D 28 MAY 2001
WIPO PCT

4T

出願人又は代理人 の書類記号 KUV-101PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/02023	国際出願日 (日.月.年) 30.03.00	優先日 (日.月.年) 31.03.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁷ A01K 67/027		
出願人 (氏名又は名称) 学校法人慶應義塾		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。 <input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>2</u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.10.00	国際予備審査報告を作成した日 09.05.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 長 井 啓 子 	2B 9123
電話番号 03-3581-1101 内線 3236		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-20 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 4-6, 8, 10, 11 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 2, 3, 7, 9 項、 22.02.01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-4 ~~ページ~~図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 明細書の配列表の部分 第 1/2-2/2 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 1 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲

2-11

有

請求の範囲

無

進歩性 (IS)

請求の範囲

2-11

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲

2-11

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲2-11に係る発明は、国際調査報告で引用された文献に対しても進歩性を有する。

国際調査報告で引用されたいずれの文献にも、自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を用いることは開示されておらず、またそれは当業者が容易に想到し得ないことである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

請求の範囲

1. (削除)
2. (補正後) 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物の免疫担当細胞が移植されている非ヒト哺乳動物であって、自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生またはT細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物。
3. (補正後) 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を抗原タンパク質で免疫し、その免疫担当細胞が移植されている非ヒト哺乳動物であって、自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生またはT細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物。
4. 免疫担当細胞の移植が、免疫不全非ヒト哺乳動物に対して行われている、請求項2または3に記載の非ヒト哺乳動物。
5. 免疫不全非ヒト哺乳動物が、RAG2 遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物である、請求項4に記載の非ヒト哺乳動物。
6. 免疫担当細胞が脾細胞である、請求項2から5のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。
7. (補正後) 自己免疫疾患が尋常性天疱瘡である、請求項2から6のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。
8. 抗原タンパク質がデスモグレイン3 タンパク質である、請求項7に記載の非ヒト哺乳動物。
9. (補正後) げっ歯類である、請求項2から8のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。
10. マウスである、請求項9に記載の非ヒト哺乳動物。
11. 自己免疫疾患の抗原タンパク質に反応する抗体の産生またはT細胞の活性化により、自己免疫疾患の表現型を示す非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 21/1 -

(a) 自己免疫疾患の抗原遺伝子を欠損している非ヒト哺乳動物を自己免疫疾患の抗原タンパク質で免疫する工程、

(b) 該非ヒト哺乳動物から免疫担当細胞を調製する工程、および

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 KUV-101PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/02023	国際出願日 (日.月.年) 30.03.00	優先日 (日.月.年) 31.03.99
出願人(氏名又は名称) 学校法人慶應義塾		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A 0 1 K 6 7 / 0 2 7

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A 0 1 K 6 7 / 0 2 7, C 1 2 N 1 5 / 1 2

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Amagai M. et al, Journal of Clinical Investigation, vol.105 (5), p.625-631 (2000)	1-18
PX	Fan Ji-Lao et al., Journal of Immunology, vol.153, p.6228-6235 (1999)	1, 9, 10
X	大野 雄弘ら, 医学のあゆみ, Mar. 別冊, p.282-284 (1995)	1, 9, 10
Y	Amagai M. et al., Journal of Investigative Dermatology, vol.110(4), p.482 (1998)	7-10, 15-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 7 . 0 6 . 0 0

国際調査報告の発送日

11.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子



2 B

9 1 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Koch P. J. et al., Journal of Cell Biology, vol.137(5), p.109 1-1102 (1997)	1-18
A	Juhasz I. et al., Journal of Clinical Investigation, vol.92 (5), p.2401-2407 (1993)	1-18

THIS PAGE BLANK (USPTO)